

Rec'd PCT/PTO 1 JAN 2005

PCT/JP03/09272

22.07.03

10/521947

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 05 SEP 2003

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年 7月22日

出願番号  
Application Number: 特願2002-212336  
[ST. 10/C]: [JP2002-212336]

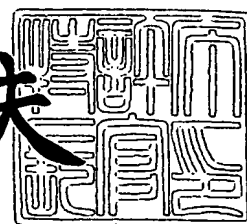
出願人  
Applicant(s): 名糖産業株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月21日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P-9720

【提出日】 平成14年 7月22日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C08B 37/02

【発明の名称】 ラクトバシラス・カゼイ 亜種 カゼイ増殖促進用組成物

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 岐阜県大垣市丸の内2丁目50番地 パサージュ大垣902

【氏名】 安田 憲司

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府豊中市岡町北1-1-8

【氏名】 小川 知彦

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市南区道德新町5-29

【氏名】 長谷川 正勝

【特許出願人】

【識別番号】 000243962

【氏名又は名称】 名糖産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ラクトバシラス・カゼイ 亜種 カゼイ増殖促進用組成物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ラクトバシラス・カゼイ 亜種 カゼイを選択的に増殖させるための、デキストランを含む菌増殖促進用組成物。

【請求項 2】 さらに、ラクトバシラス・カゼイ 亜種 カゼイを含む請求項 1 に記載の菌増殖促進用組成物。

【請求項 3】 デキストランの分子量が 2,000～4,000 万である請求項 1 に記載の菌増殖促進用組成物。

【請求項 4】 請求項 1～3 のいずれか一項に記載の菌増殖促進用組成物を含む医薬組成物。

【請求項 5】 請求項 1～3 のいずれか一項に記載の菌増殖促進用組成物を含む健康用食品。

【請求項 6】 請求項 1～3 のいずれか一項に記載の菌増殖促進用組成物を含む飼料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、種々の生物学的活性を有する乳酸菌の 1 種であるラクトバシラス・カゼイ 亜種 カゼイ (*Lactobacillus casei* subsp. *casei*) (以下、「*L. casei* subsp. *casei*」と略記する。)を選択的に増殖させるための、デキストランを含む菌増殖促進用組成物、及び、さらに *L. casei* subsp. *casei* を含む該菌増殖促進用組成物に関する。より具体的には、本発明は該菌増殖促進用組成物を含む生物学的活性を高めるための医薬組成物、並びに該菌増殖促進用組成物を含む生物学的活性を高めるための健康用食品及び飼料に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年プロバイオティックスと呼ばれ、生きた乳酸菌等の有用微生物からなる「微生物製剤」を整腸効果や感染症の防止、免疫賦活等を目的として摂取すること

が注目されている。しかしながら、その有用微生物がヒトや動物等の腸内で生育・定着できるかが疑問視されている。有用微生物が腸内で生育・定着できなければ、期待されるその有用微生物の持つ生物学的活性が持続的に得られないことになる。それを補うための対策としては、その微生物製剤を随時補給する事が提唱・実行されているのが実情である。一方、プロバイオティックスに含まれる有用微生物が資化できるオリゴ糖等をプレバイオティックスと呼び、またそれをプロバイオティックスと一緒にしたものをシンバイオティックスと呼び、それらもまた、上記目的のために、ヒトや動物等に投与されている。しかしながら、そのプレバイオティックスがかなり多くの目的とする菌以外の腸内細菌に資化される場合には、腸内でそのプレバイオティックスの奪い合いになり目的の有用微生物を選択的に生育・定着させることは難しい。

#### 【0003】

##### 【発明が解決しようとする課題】

プロバイオティックスと呼ばれている有用微生物をヒトや動物等に摂取させた後に、これらの有用微生物を随時補給しなくても、腸内で選択的に発育増殖・定着させることで、また腸内に常在する有用微生物を腸内で選択的に発育増殖させることで、有用微生物由来の種々の生物学的活性を生体内で持続させることを課題とする。

#### 【0004】

##### 【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、数ある有用微生物の中で、デキストランを資化して発育増殖することが出来る菌種として、*L. casei* subsp. *casei* を生体外 (in vitro) 試験において見出した。その *L. casei* subsp. *casei* は、アプルーブドリフト (Approved Lists) (1980) において分類・命名されているものである。この菌はヒトや動物等の腸内にも常在するグラム陽性の通性嫌気性桿菌であり、他の菌と共に腸内細菌叢を形成している。

#### 【0005】

そこで、まず、この菌自体に生物学的活性、1例として皮下免疫の際の免疫賦活作用が存在するかどうかを確認したところ、体液性免疫及び細胞性免疫を増強

・維持することが分かった。次に、デキストランを経口摂取させることで、*L. casei* subsp. *casei* をヒトや動物等の腸内で選択的に発育増殖・定着させ、その菌の有する生物学的活性を持続させることができるかどうかを確認するために、マウスを用いて初回のみに *L. casei* subsp. *casei* を投与し、その後、デキストランをマウスに経口で継続的に摂取させたところ、本菌はデキストランを資化して腸内で発育増殖・定着し、その菌の有する生物学的活性、例えば、体液性免疫及び細胞性免疫を増強・維持することを生体内（*in vivo*）試験において見出すに至った。

#### 【0006】

他方、デキストラン自身にも種々の生物学的活性を有することが知られているが、デキストラン単独投与に比べ、デキストランを *L. casei* subsp. *casei* と併行投与した場合は、高い効果が維持され、相乗効果が大きい事が確認された。

#### 【0007】

本発明は、以上のようにして達成された。本発明の要旨は、以下のとおりである。

- (1) ラクトバシラス・カゼイ 亜種 カゼイを選択的に増殖させるための、デキストランを含む菌増殖促進用組成物。
- (2) さらに、ラクトバシラス・カゼイ 亜種 カゼイを含む(1)に記載の菌増殖促進用組成物。
- (3) デキストランの分子量が2,000～4,000万である(1)に記載の菌増殖促進用組成物。
- (4) (1)～(3)のいずれかに記載の菌増殖促進用組成物を含む医薬組成物。
- (5) (1)～(3)のいずれかに記載の菌増殖促進用組成物を含む健康用食品。
- (6) (1)～(3)のいずれかに記載の菌増殖促進用組成物を含む飼料。

#### 【0008】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の組成物は、*L. casei* subsp. *casei*を選択的に増殖させるための、デ

キストランを含む菌増殖促進用組成物、及び、さらに*L. casei* subsp. *casei* を含む該菌増殖促進用組成物である。本発明の組成物に用いられるデキストランは、当業者によく知られた通常の方法により合成、調整等を行うことが可能である。また、本発明に用いられる*L. casei* subsp. *casei*の培養、遺伝子組換え等については、当業者によく知られた通常の方法によって行うことができる。

#### 【0009】

(本発明に用いられるデキストランの説明)

デキストランは $\alpha$  1, 6結合を主体としたグルコースの多糖体である。本発明に用いられるデキストランとしては、例えば、市場で入手したものを用いてもよく、または、リユーウコノストク (*Leuconostoc*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属からなる群より選ばれる細菌、例えば、リユーウコノストク・メゼンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) 等を、通常の培養条件にて、例えば、シヨ糖含有栄養培地で培養して得られたものを用いてもよい。

#### 【0010】

(本発明に用いられるデキストランの分子量)

本発明に用いられるデキストランの分子量としては、分子量が2, 000~4, 000万、好ましくは4, 000~500万、更に好ましくは4, 000~200万である。なお、デキストランの分子量が2, 000未満であると、*L. casei* subsp. *casei*以外の細菌が増殖することがあるため好ましくない。本発明に用いられるデキストランとしては、例えば、上記細菌の培養により得られたデキストランをそのまま、または、更にこれを部分的加水分解処理して適当な分子量のデキストランにしたものを用いることが可能である。

#### 【0011】

(本発明に用いられる*L. casei* subsp. *casei*)

本発明において*L. casei* subsp. *casei*は、生菌または発育増殖可能な凍結乾燥菌体等の形態で使用する事ができる。本発明に用いられる*L. casei* subsp. *casei*は、野生型その他、本発明の菌増殖用組成物に含まれるデキストランに対する資化性を損なわない範囲における*L. casei* subsp. *casei*の遺伝子組換え体を用いることもできる。また、*L. casei* subsp. *casei*由来のデキストラン資化性

に關与する遺伝子を他の微生物に導入した遺伝子組換え体を用いることもできる。好ましくは、遺伝子組換え体は、*L. casei* subsp. *casei*に遺伝子組換えによって新たな生物学的活性を發現させた新規微生物、または*L. casei* subsp. *casei*由来のデキストラン資化性に關与する遺伝子を他の微生物に導入した別の新規微生物である。

#### 【0012】

本發明の組成物は、*L. casei* subsp. *casei*を選択的に増殖させるための、デキストランを含む菌増殖促進用組成物、及び、さらに*L. casei* subsp. *casei*を含む該菌増殖促進用組成物である。本發明の組成物は、デキストラン、または、さらに*L. casei* subsp. *casei*を含むこと以外は、当業者によく知られた通常の方法を採用し、調製、投与等を行うことが可能である。

#### 【0013】

(本發明の組成物の投与形態)

本發明の組成物は、デキストラン単体、またはデキストランと*L. casei* subsp. *casei*の混合物であってもよいが、好ましくは、これらを製剤学上よく知られた製剤学的に許容し得る希釈剤乃至担体等と組合わせて、デキストランを含む固状、半固状または液状の組成物、または、デキストランと*L. casei* subsp. *casei*を共に加工した固状、半固状または液状の組成物として提供することができる。なお、本發明の組成物とは、本發明のデキストランと*L. casei* subsp. *casei*を組み合わせた形態の他、本發明のデキストランと*L. casei* subsp. *casei*を個別に加工したものを使用時に組み合わせる形態を含む。本發明の組成物における希釈剤乃至担体等の含有量は目的や用法に応じて適宜変化させられ、特に制限されるものではないが、一般的に組成物重量に基づいて約0.1～約99.9重量%、好ましくは約1～約99重量%、更に好ましくは約5～約95重量%の含有量を例示することができる。

#### 【0014】

尚、液状でデキストランと*L. casei* subsp. *casei*を併存させると、菌の資化によりデキストラン含量が次第に減少していくので、長期間の併存は避ける方が好ましい。そこで、個別に加工・包装し、摂取時に混合するか、個別に摂取する



ことが望ましい。

#### 【0015】

本発明の医薬組成物は、本発明の組成物単体であってもよいが、好ましくは、これらを薬学上よく知られた薬学的に許容し得る希釈剤乃至担体等と組合わせて、軟カプセル剤、硬カプセル剤、顆粒剤、丸剤、散剤、錠剤、シロップ剤、トローチ剤、エリキシル剤等の如き剤型に調製されたものであってもよい。このような剤型への調製手段は当業者によく知られている。このような剤型への調製において、各剤型に適した薬学上よく知られた薬学的に許容し得る希釈剤乃至担体等を更に含有させることができる。

本発明の医薬組成物を、ヒトや動物等の腸内において*L. casei* subsp. *casei* を選択的に発育増殖・定着させ、または、腸内に常在する*L. casei* subsp. *casei* を腸内で選択的に発育増殖させ、*L. casei* subsp. *casei* 由来の種々の生物学的活性を生体内で持続させるための医薬として用いることができる。

本発明の医薬組成物の調製において、本発明の組成物の添加量は、下記本発明の組成物の投与量及び投与周期に関する記載を参照して適宜決定することができる。

#### 【0016】

本発明の健康用食品は、本発明の組成物と、食品や飲料等の組成物を含むものである。なお、本発明の健康用食品とは、本発明の組成物と食品や飲料等の組成物を組み合わせた形態の他、本発明の組成物と食品や飲料等の組成物を個別に加工したものを摂取時に組み合わせる形態を含む。このような食品または飲料組成物としては、例えば、キャンディー、チョコレート、ビスケット等の菓子類、パンや麺類、粉末及び液体等の飲料、ヨーグルト等の乳製品等を挙げることができる。特にヨーグルトの場合、この*L. casei* subsp. *casei* を使ってヨーグルトを製造することができ、摂取時にデキストランを混合するか、個別に摂取することが望ましい。

本発明の飼料は、本発明の組成物と、家畜・家禽や魚類、ペット等の配合飼料を含むものである。なお、本発明の飼料とは、本発明の組成物と飼料組成物を組み合わせた形態の他、本発明の組成物と飼料組成物を個別に加工したものを摂取

時に組み合わせる形態を含む。

本発明の健康用食品または飼料をヒトや動物等の腸内において *L. casei* subsp. *casei* を選択的に発育増殖・定着させ、または、腸内に常在する *L. casei* subsp. *casei* を腸内で選択的に発育増殖させ、*L. casei* subsp. *casei* 由来の種々の生物学的活性を生体内で持続させるために用いることができる。

本発明の健康用食品及び飼料の調製において、本発明の組成物の添加量は、下記本発明の組成物の投与量及び投与周期に関する記載を参照して適宜決定することができる。

#### 【0017】

(本発明の組成物の投与量及び投与周期)

本発明の組成物の投与量としては、組成物中に含まれるデキストランの投与量として、0.01mg～2g/kg体重・日、好ましくは0.1mg～1g/kg体重・日、更に好ましくは1mg～100mg/kg体重・日であり、少なくとも本発明のデキストランを含む組成物を通常毎日投与することが好ましい。なお、*L. casei* subsp. *casei* は本来ヒトや動物等の腸内常在菌であるが、*L. casei* subsp. *casei* の生物学的活性の確実な効果を誘導するためには、生菌または発育増殖可能な凍結乾燥菌体を少なくとも1回、好ましくは適当な間隔で投与することが好ましい。また、より確実な効果を誘導するために、毎日投与することもできる。

#### 【0018】

(本発明の組成物の適用対象)

本発明の組成物は、ヒト含む哺乳類、鳥類、爬虫類、魚類、甲殻類、昆虫等あらゆる生物を対象とすることができる。

#### 【0019】

(本発明の組成物により付与及び／または向上されることが期待できる生物学的活性)

免疫賦活作用の他、一般的に言われている乳酸菌の有する生物学的活性、例えば、抗腫瘍、血圧降下、抗酸化、抗潰瘍、抗HIV、脂質代謝改善、悪性腫瘍再発抑制、抗炎症、自己免疫疾患予防・抑制、血清コレステロール低下、血糖低下

、IgE抗体産生抑制、抗アレルギー、インターロイキン12産生促進、ミネラル吸収促進、ミネラル強化、アルコール吸収代謝調整、尿路感染症予防治療、有害物質産生抑制、整腸、便秘防止、美容、高アンモニア血症や肝性脳症等の治療・防止、感染予防、糞便悪臭抑制、家畜・家禽腸内pH低下、生育向上、肥育促進、及び産卵助長等の作用が期待できる。

#### 【0020】

##### 【実施例】

以下、本発明を実施例によって、更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【0021】

##### 【実施例1】 ショ糖を主原料としたデキストランの製造方法

ショ糖を主原料とした培地（ショ糖含有栄養培地）に、乳酸菌の一種である *Leuconostoc mesenteroides* を接種し、25℃、24時間、嫌気性下で培養した後、培養上澄にメタノールを加え、得られた沈殿物を蒸留水に溶解し、不溶物を除いた後に、再度メタノールを加え、得られた沈殿物を蒸留水に再溶解し、噴霧乾燥をしてデキストランを得た。更にこれを部分的加水分解処理してメタノール分画、噴霧乾燥を経て各種分子量のデキストランを得た。

#### 【0022】

##### 【実施例2】 腸内細菌のデキストラン資化性試験

分子量（数平均）10,000のデキストラン（以下の実施例においても特に規定しない場合はこの分子量のデキストランを用いる）を0.5%添加したPYF培地（ペプトンイーストエキストラクトフィルデス液体培地）（Peptone yeast extract Fildes solution broth）に各種腸内関連細菌を接種し、デキストランの資化性を調べた。その結果、*L. casei* subsp. *casei* の2株（JCM1134及びJCM8129）でデキストランの資化性を確認することができた。しかし、他の*Lactobacillus*属やビフィドバクテリウム（*Bifidobacterium*）属等の乳酸菌、及び、その他の腸内関連細菌に関しては、デキストランの資化性は見られなかった。（表1参照）

#### 【0023】

【表 1】

[表1-1]腸内関連細菌のデキストラン資化性

菌名	菌株名	デキストラン 資化性
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i> subsp. <i>casei</i>	+
	<i>casei</i> subsp. <i>casei</i>	+
	<i>acidophilus</i>	—
	<i>acidophilus</i>	—
	<i>agilis</i>	—
	<i>amylovorus</i>	—
	<i>avarius</i> subsp. <i>avarius</i>	—
	<i>brevis</i>	—
	<i>buchneri</i>	—
	<i>casei</i> subsp. <i>alactosus</i>	—
	<i>casei</i> subsp. <i>fusiformis</i>	—
	<i>casei</i> subsp. <i>plantarum</i>	—
	<i>casei</i> subsp. <i>pseudopiantarum</i>	—
	<i>casei</i> subsp. <i>ramnosus</i>	—
	<i>crispatus</i>	—
	<i>curvatus</i>	—
	<i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	—
	<i>delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	—
	<i>fermentum</i>	—
	<i>gallinarum</i>	—
	<i>gasseri</i>	—
	<i>johnsonii</i>	—
	<i>oris</i>	—
	<i>paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	—
	<i>plantarum</i>	—
	<i>reuteri</i>	—
	<i>salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i>	—
	<i>salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	—
<i>Clostridium</i>	<i>butyricum</i>	—
	<i>perfringens</i>	—
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	—
<i>Fusobacterium</i>	<i>varium</i>	—
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	—
	<i>faecium</i>	—
<i>Eubacterium</i>	<i>limosum</i>	—
<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes</i>	—
<i>Bacteroides</i>	<i>fragilis</i>	—
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	—
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	—

【0024】

【表 2】

[表1-2]腸内関連細菌のデキストラン資化性

菌名	菌株名	デキストラン 資化性
<i>Bifidobacterium</i>		
<i>adolescentis</i>	JCM 1275	—
<i>angulatum</i>	JCM 7096	—
<i>animalis</i>	JCM 1190	—
<i>asteroides</i>	JCM 8230	—
<i>bifidum</i>	JCM 1209	—
<i>boum</i>	JCM 1211	—
<i>breve</i>	JCM 1192	—
<i>catenulatum</i>	JCM 1194	—
<i>choerinum</i>	JCM 1212	—
<i>coryneforme</i>	JCM 5819	—
<i>cuniculi</i>	JCM 1213	—
<i>dentium</i>	JCM 1195	—
<i>gallicum</i>	JCM 8224	—
<i>gallinarum</i>	JCM 6291	—
<i>indicum</i>	JCM 1302	—
<i>infantis</i>	JCM 1222	—
<i>longum</i>	JCM 1217	—
<i>magnum</i>	JCM 1218	—
<i>merycicum</i>	JCM 8219	—
<i>minimum</i>	JCM 5821	—
<i>pseudocatenulatum</i>	JCM 1200	—
<i>pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	JCM 5820	—
<i>pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	JCM 1205	—
<i>pullorum</i>	JCM 1214	—
<i>ruminantium</i>	JCM 8222	—
<i>saeculare</i>	JCM 8223	—
<i>subtile</i>	JCM 5822	—
<i>suis</i>	JCM 1269	—
<i>thermophilum</i>	JCM 1207	—

## 【0025】

更に、*L. casei* subsp. *casei* の2株でデキストランの分子量の違いによる資化性を調べた。その結果、試験に供した全ての分子量のデキストランでデキストランの資化性を確認することができた。しかし、分子量が小さい方が資化されやすい傾向があった。(表2参照)

## 【0026】

【表 3】

[表2]デキストランの分子量による資化性の違い		
デキストラン	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	
分子量	JCM 1134	JCM 8129
2,000	+++	+++
4,000	+++	+++
7,000	++	++
10,000	++	++
14,000	++	++
40,000	++	++
200,000	+	+
2,000,000	+	+

【0027】

【実施例 3】 マウス糞便中の *L. casei* subsp. *casei* 菌数に与えるデキストランの影響

8週齢のBALB/c雄マウス12匹を6匹ずつ2群に分けた。各群を(1)コントロール群と(2)デキストラン群とした。実験開始より試験期間を通して、(1)には通常食を、(2)にはデキストランを通常食1kgあたり75mg添加して与えた。試験開始より3日間にわたりどちらの群にも *L. casei* subsp. *casei* をマウス1匹あたり $10^6$ 個経口接種した。28日目に解剖し大腸より採取した糞便をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で段階希釈してデキストラン添加LB培地に塗抹し37℃48時間培養して、コロニーをグラム染色で確認した上で、糞便中の *L. casei* subsp. *casei* 菌数を求めた。その結果、デキストラン群の *L. casei* subsp. *casei* 菌数はコントロール群のそれに比べて有意に多かった。(図1参照)

【0028】

【実施例 4】 抗原経口投与における体液性免疫のデキストランによる増強

8週齢のBALB/c雄マウス30匹を6匹ずつ5群に分けた。各群は、(1)コントロール群、(2)BSA(牛血清アルブミン)群、(3)BSA+*L. casei* subsp. *casei* 群、(4)BSA+デキストラン群、(5)BSA+*L. casei* subsp. *casei* +デキストラン群とした。実験開始より試験期間を通して、(1)、(2)と(3)には通常食を、(4)と(5)にはデキストランを通常食1kgあたり75mg添加して与え

た。試験開始より3日間にわたり(3)と(5)には *L. casei* subsp. *casei* をマウス1匹あたり  $10^6$ 個経口接種した。3、4日目に(2)～(5)にはBSAをPBSに  $10\text{ mg/ml}$  の濃度で溶解し、マウス1匹あたり  $1\text{ mg}$  ( $100\text{ }\mu\text{ l}$ ) 経口投与した。33、34日目に(2)～(5)には3、4日目と同様にBSAをマウス1匹あたり  $1\text{ mg}$  経口投与した。その5日後に眼下静脈より採血し、抗BSA抗体価をELISAにより調べた。その結果、(5)BSA + *L. casei* subsp. *casei* +デキストラン群で特異抗体価が有意に高かった。(図2参照)

#### 【0029】

##### 【実施例5】 抗原経口投与における細胞性免疫のデキストランによる増強

8週齢のBALB/c雄マウス30匹を6匹ずつ5群に分けた。各群は、(1)コントロール群、(2)BSA群、(3)BSA + *L. casei* subsp. *casei* 群、(4)BSA + デキストラン群、(5)BSA + *L. casei* subsp. *casei* +デキストラン群とした。実験開始より試験期間を通して、(1)、(2)と(3)には通常食を、(4)と(5)にはデキストランを通常食  $1\text{ kg}$  あたり  $75\text{ mg}$  添加して与えた。試験開始より3日間にわたり(3)と(5)には *L. casei* subsp. *casei* をマウス1匹あたり  $10^6$ 個経口接種した。3、4日目に(2)～(5)には、BSAをPBSに  $10\text{ mg/ml}$  の濃度で溶解し、マウス1匹あたり  $1\text{ mg}$  ( $100\text{ }\mu\text{ l}$ ) 経口投与した。33、34日目に(2)～(5)には3、4日目と同様にBSAをマウス1匹あたり  $1\text{ mg}$  経口投与した。その5日後、BSAをPBSに溶解し、マウス耳朶の皮内に投与し、24、48、72時間後に耳朶の厚みを測定した。その結果、(5)BSA + *L. casei* subsp. *casei* +デキストラン群の耳朶の厚みが有意に増加していた。(図3参照)

#### 【0030】

##### 【実施例6】 抗原皮下投与における体液性免疫のデキストランによる増強

8週齢のBALB/c雄マウス30匹を6匹ずつ5群に分けた。各群は、(1)コントロール群、(2)BSA群、(3)BSA + *L. casei* subsp. *casei* 群、(4)BSA + デキストラン群、(5)BSA + *L. casei* subsp. *casei* +デキストラン群とした。実験開始より試験期間を通して、(1)、(2)と(3)には通常食を、(4)と(5)にはデキストランを通常食  $1\text{ kg}$  あたり  $75\text{ mg}$  添加して与えた。試験開始より3日

間にわたり(3)と(5)には *L. casei* subsp. *casei* をマウス1匹あたり  $10^6$ 個経口接種した。3日目にFIA(フロイント不完全アジュバント)(Freund's incomplete adjuvant)を用いて、それぞれ、(1)にはPBS(リン酸緩衝生理食塩水)+FIA、(2)~(5)にはBSA 5mg/ml+FIAをそれぞれ1:1で乳化させ、1匹あたり  $200\mu\text{l}$  を足蹠の皮下に投与した。35日目に3日目と同様にして追加免疫を行い、その5日後に眼下静脈より採血し、抗BSA抗体価をELISAにより調べた。その結果、(5)BSA+*L. casei* subsp. *casei* +デキストラン群で特異抗体価が有意に高かった。(図4参照)

#### 【0031】

##### 【実施例7】 抗原皮下投与における細胞性免疫のデキストランによる増強

8週齢のBALB/c雄マウス30匹を6匹ずつ5群に分けた。各群は、(1)コントロール群、(2)BSA群、(3)BSA+*L. casei* subsp. *casei* 群、(4)BSA+デキストラン群、(5)BSA+*L. casei* subsp. *casei* +デキストラン群とした。実験開始より試験期間を通して、(1)、(2)と(3)には通常食を、(4)と(5)にはデキストランを通常食1kgあたり75mg添加して与えた。試験開始より3日間にわたり(3)と(5)には *L. casei* subsp. *casei* をマウス1匹あたり  $10^6$ 個経口接種した。3日目にFIAを用いて、それぞれ、(1)にはPBS+FIA、(2)~(5)にはBSA 5mg/ml+FIAをそれぞれ1:1で乳化させ、1匹あたり  $200\mu\text{l}$  を足蹠の皮下に投与した。35日目に3日目と同様にして追加免疫を行い、その5日後、BSAをPBSに溶解し、マウス耳朶の皮内に投与し、24、48、72時間後に耳朶の厚みを測定した。その結果、(5)BSA+*L. casei* subsp. *casei* +デキストラン群の耳朶の厚みが有意に増加していた。(図5参照)

#### 【0032】

##### 【発明の効果】

本発明によれば、*L. casei* subsp. *casei*を随時摂取しなくても、*L. casei* subsp. *casei*をヒトや動物等の腸内で選択的に発育増殖・定着させることで、また腸内に常在する*L. casei* subsp. *casei*を腸内で選択的に発育増殖させることで、*L. casei* subsp. *casei*由来の種々の生物学的活性を生体内で持続させること



ができる。

**【図面の簡単な説明】**

**【図1】** 図1は、マウス糞便中の*L. casei* subsp. *casei*菌数に与えるデキストランの影響を示す図である。

**【図2】** 図2は、抗原経口投与における体液性免疫のデキストランによる増強の結果を示す図である。

**【図3】** 図3は、抗原経口投与における細胞性免疫のデキストランによる増強の結果を示す図である。

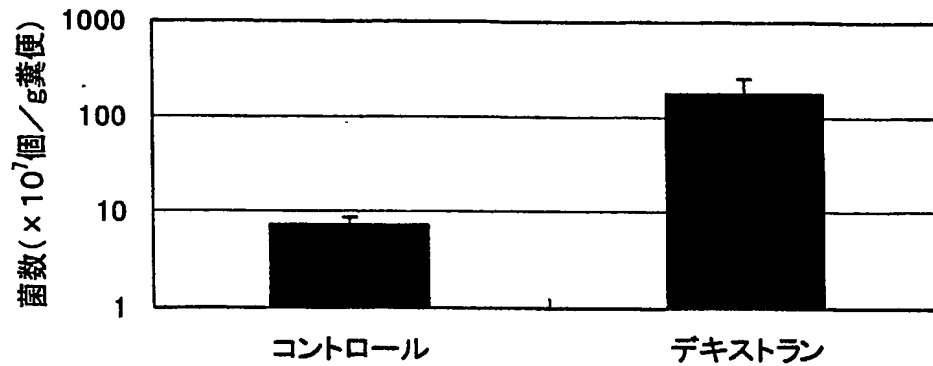
**【図4】** 図4は、抗原皮下投与における体液性免疫のデキストランによる増強の結果を示す図である。

**【図5】** 図5は、抗原皮下投与における細胞性免疫のデキストランによる増強の結果を示す図である。

【書類名】 図面

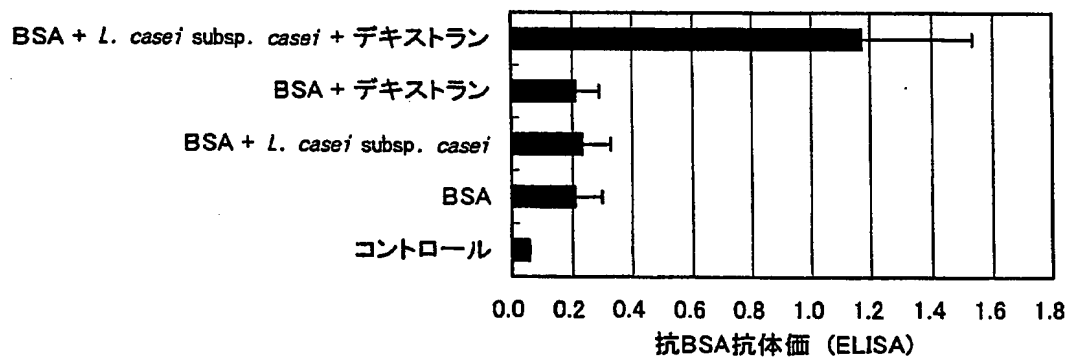
【図 1】

マウス糞便中の *L. casei* subsp. *casei* 菌数に与える  
デキストランの影響



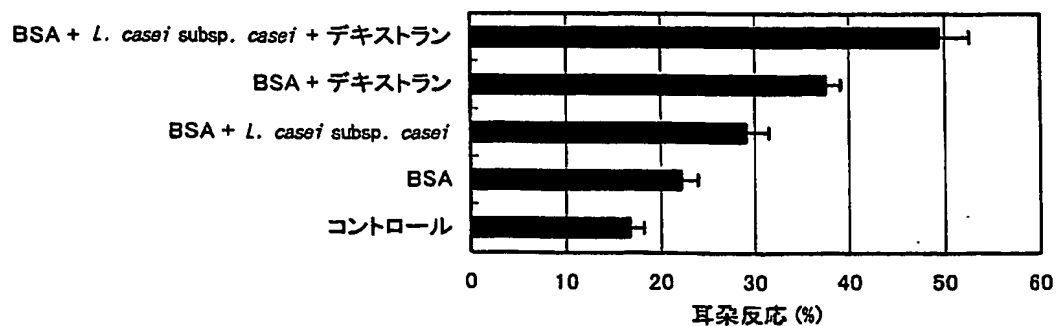
【図 2】

抗原経口投与における体液性免疫のデキストランによる増強



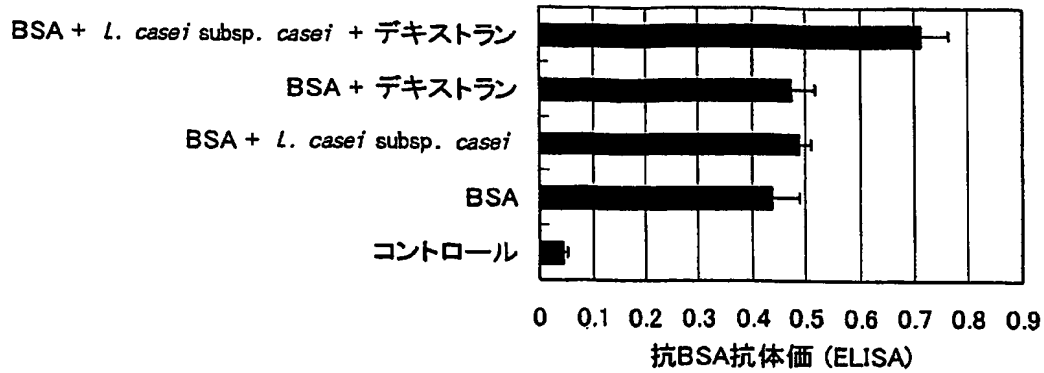
【図 3】

抗原経口投与における細胞性免疫のデキストランによる増強



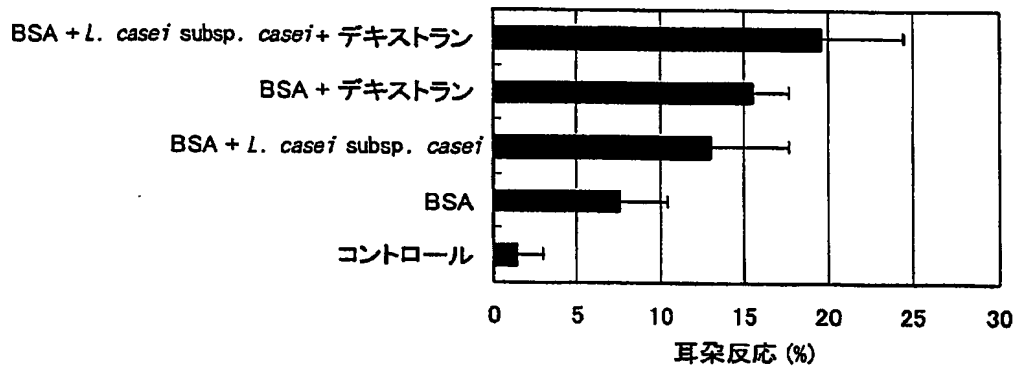
【図 4】

抗原皮下投与における体液性免疫のデキストランによる増強



【図 5】

抗原皮下投与における細胞性免疫のデキストランによる増強



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 *L. casei* subsp. *casei*を随時摂取しなくても、*L. casei* subsp. *c*  
*asei*をヒトや動物等の腸内で選択的に発育増殖・定着させることで、また腸内に  
常在する*L. casei* subsp. *casei*を腸内で選択的に発育増殖させることで、*L. ca*  
*sei* subsp. *casei*由来の種々の生物学的活性を生体内で持続させる。

【解決手段】 *L. casei* subsp. *casei* を選択的に増殖させるための、デキス  
トランを含む菌増殖促進用組成物を提供する。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 2 - 2 1 2 3 3 6

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[ 0 0 0 2 4 3 9 6 2 ]

1. 変更年月日  
[変更理由]  
住 所  
氏 名

1 9 9 0 年 9 月 3 日  
新規登録  
愛知県名古屋市西区笹塚町 2 丁目 4 1 番地  
名糖産業株式会社